



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

**Caracterização estrutural e ultraestrutural dos  
espermatozóides de representantes da família Drosophilidae  
(Diptera)**

Ingrid Gracielle Martins da Silva

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Sônia Nair Bão

Dissertação de Mestrado

**2013**

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

**Caracterização estrutural e ultraestrutural dos  
espermatozóides de representantes da família Drosophilidae  
(Diptera)**

Ingrid Gracielle Martins da Silva

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília, julho de 2013

## Ficha Catalográfica

Silva, Ingrid Gracielle Martins da

**Caracterização estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides de representantes da família Drosophilidae (Diptera).**/ Ingrid

Gracielle Martins da Silva.

Brasília, 2013.

41 p.: il.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília, Brasília.

1. Introdução. 2. Justificativa. 3. Objetivos. 4. Materiais e Métodos. 5. Resultados. 6. Discussão. I. Universidade de Brasília. II. Título

“Queremos buscar a verdade, não importa aonde ela nos leve. Mas para encontrá-la, precisaremos tanto de imaginação quanto de ceticismo. Não tenhamos medo de fazer especulações, mas tenhamos o cuidado de distinguir a especulação do fato. “

Adaptado de Carl Sagan

## AGRADECIMENTOS

À Deus por mais essa oportunidade de aprendizado. À minha família, pela criação que tive, todos os ensinamentos e por todo o apoio que sempre recebi. À minha avó Beatriz, pelo exemplo de vida e por todo carinho dado ao longo de todos esses anos.

À minha mãe, Maria de Jesus, pelo apoio e suporte nas horas necessárias, pelo carinho e força que sempre me deu e pelo exemplo de dedicação e força para com seus filhos em todos os momentos. A meu pai, Miguel, por todo o apoio e carinho que me foi dedicado e todo o incentivo para sempre correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, Isla e Esdras, pelas pessoas incríveis que são, por sempre me darem apoio nas horas necessárias, por partilharem comigo e estarem ao meu lado em todos os momentos sejam eles bons ou ruins.

Aos meus amigos, pelos incontáveis bons momentos, por me ajudarem sempre, por fazerem parte da minha vida. À Ana Carolina Vaqueiro (Zelinha) por estar presente em todas as horas, seja incentivando, seja aconselhando ou apanhando comigo nas artes marciais ☺. Às amigas que estão longe, Paula Neves, Jayne Maiura, Ana Carolina Paes, o meu muito obrigada! Por me aturarem nos momentos de lamento, pelos incentivos a sempre continuar e nunca desistir e por me mostrarem que sempre devemos ir atrás do que acreditamos.

À minha mentora, chefe e orientadora, Prof<sup>a</sup> Sônia Nair Bão, pelos anos de ensinamentos, não só acadêmicos, mas também pessoais e profissionais, que juntos me ajudaram a crescer. Pelos exemplos práticos de responsabilidade, dedicação e amor às coisas que nos são importantes.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica, pelos válidos conselhos, pelo convívio diário sempre alegre.

À Prof<sup>a</sup> Rosana Tidon e ao Laboratório de Biologia Evolutiva, pela cessão dos espécimes utilizados nesse trabalho e por toda paciência e auxílio para que minhas dúvidas a respeito das drosófilas fossem sanadas.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Animal.

À Universidade de Brasília pelo suporte e a estrutura física necessária para a realização do trabalho. Às agências financiadoras CAPES, FINEP, CNPq e FAPDF pelos auxílios recebidos.

## RESUMO

A família Drosophilidae é formada por dípteros braquíceros amplamente distribuídos pelas diferentes regiões do planeta. É composta por cerca de 4.000 espécies, 300 delas encontradas no Brasil. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente a estrutura do aparelho reprodutor masculino interno e a ultraestrutura do espermatozóide das espécies: *Drosophila mercatorum*, *Drosophila simulans*, *Drosophila cardini*, *Drosophila nebulosa*, *Drosophila sturtevanti* e *Zaprionus indianus*. Para essas espécies, o aspecto estrutural do aparelho reprodutor interno condiz com o descrito para outros drosofilídeos, contudo, diferenças quanto ao tamanho e coloração são características para cada uma delas. O espermatozóide dessas espécies se mostrou longo e fino, apresentando uma grande variação quanto ao tamanho entre as espécies. A ultraestrutura do espermatozóide revelou que o padrão morfológico condiz com o encontrado para a maioria dos insetos. A região da cabeça apresenta núcleo condensado e acrossoma posicionado lateralmente ao núcleo. Na região da cauda, o axonema apresenta o padrão 9+9+2 comumente descrito para outras espécies de Diptera. As espécies apresentaram diferenças quanto ao formato e tamanho dos derivados mitocondriais. A análise citoquímica utilizando EPTA também revelou diferenças quanto à localização das proteínas básicas nos derivados mitocondriais. Os resultados obtidos contribuem para ampliar a base de dados a respeito da família Drosophilidae fornecendo dados que talvez possam vir a contribuir para sanar dúvidas existentes dentro do grupo, bem como, contribuir com análises filogenéticas futuras.

**Palavras-chave:** drosófila; ultraestrutura; espermatozóide.

## ABSTRACT

The family Drosophilidae is composed of brachycera dipterans largely distributed throughout the diverse regions of the planet. It comprises approximately 4,000 species, from which 300 occur in Brazil. The aim of the present study was to morphologically characterize the structure of the internal male reproductive system and the ultrastructure of spermatozoa of the species: *Drosophila mercatorum*, *Drosophila simulans*, *Drosophila cardini*, *Drosophila nebulosa*, *Drosophila sturtevanti* and *Zaprionus indianus*. The structural aspect of the internal male reproductive system in these species is similar to that described for other drosophilids, although differences in size and color are peculiar to each of them. The spermatozoon in these species is relatively elongated and thin and a large variation in size among the studied species was observed. Analysis of the ultrastructure of spermatozoa revealed a morphological pattern which resembled that described for most insects. Sperm head region displayed a condensed nucleus and an acrosome located laterally to such nucleus. In the tail region, axoneme showed the 9+9+2 pattern commonly described for other Diptera species. Differences in size and shape of mitochondrial derivatives among the studied species were found. Cytochemical analysis with EPTA also revealed differences regarding basic proteins localization within mitochondrial derivatives. The results of the present study contribute to enrich the database of the Drosophilidae family, which will possibly clarify doubts as well as assist future phylogenetic analysis.

**Keywords:** *Drosophila*; ultrastructure; spermatozoa.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Micrografias do aparelho reprodutor interno e dos espermatozóides..... 14
- Figura 2.** Micrografias Eletrônicas do espermatozóide de *D. mercatorum*..... 19
- Figura 3.** Micrografias Eletrônicas do espermatozóide de *D. simulans*..... 20
- Figura 4.** Micrografias Eletrônicas dos espermatozóides de *D. cardini*, *D. nebulosa*, *D. sturtevantii* e *Z. indianus*..... 21
- Figura 5.** Micrografias Eletrônicas dos espermatozóides tratados com ácido tânico... 22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tamanho médio da região da cabeça.....	13
<b>Tabela 2.</b> Quadro geral comparativo da ultraestrutura da região da cauda.....	18

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**DAPI** – 4,6-diamino-2-phenyndole

**EPTA** – Ácido etanólico fosfotúngstico

**PTA** – Ácido fosfotúngstico

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 O espermatozóide.....	1
1.2 A Ordem Diptera.....	3
1.3 A família Drosophilidae.....	4
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	7
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	8
3.1 Objetivos específicos.....	8
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
4.1 Microscopia de Luz.....	9
4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	10
<b>5. RESULTADOS</b> .....	12
5.1 Microscopia de Luz.....	12
5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	15
5.3 Análise Citoquímica.....	16
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	23
6.1 Microscopia de Luz.....	23
6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24
6.3 Análise Citoquímica.....	26
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

# 1. Introdução

## 1.1 O espermatozóide

Desde sua descoberta, em 1670 por Leeuwenhoek, o espermatozóide tem sido um dos tipos celulares que mais desperta e fascina os estudiosos. São células que em geral apresentam algumas características morfológicas básicas: pequenos, móveis, compactos e altamente especializados para a fertilização do óvulo. Ao longo do tempo foram sendo modificadas de forma a otimizarem a transferência do material genético masculino para o óvulo, processo no qual ocorre a transmissão de características hereditárias e posterior desenvolvimento do organismo.

É uma célula altamente complexa, sendo o tipo celular que possui a maior diversidade atualmente conhecida. Essa diversidade resulta das inúmeras modificações morfológicas ocorridas ao longo dos processos evolutivos, diferentemente do que é observado em outros tipos celulares (Baccetti & Afzelius, 1976). Tais modificações seriam um reflexo de adaptações aos mais diversos ambientes de fertilização e pressões seletivas deles decorrentes, e teriam surgido independentemente em diversos grupos (Franzen, 1970; Jamieson, 1987). Em insetos, por exemplo, essa diversidade pode ser vista quando comparamos o tamanho dos espermatozoides que podem variar desde 1,7  $\mu\text{m}$ , em algumas espécies de cupins (Baccetti *et al.*, 1981), a 58.000  $\mu\text{m}$  em *Drosophila bifurca* (aproximadamente 20 vezes o tamanho do macho que o produz) (Pitnick *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, como forma de buscar uma resposta para tamanha diversidade, estudos como os de Joly e colaboradores (2004) e Higginson e colaboradores (2012) vem sendo realizados na tentativa de mapear a relevância e influência de aspectos do trato reprodutivo da fêmea (ex: dimensões do ducto da espermateca, ou receptáculo) sobre a

morfologia do espermatozóide, além de correlacioná-los com outros aspectos como a competição espermática.

Observações acerca dos aspectos evolutivos do espermatozóide e sua especificidade, uma vez que constituem um caráter único de identidade para a espécie que o produz, têm feito com que a utilização de sua ultraestrutura seja amplamente aceita em estudos de filogenia e taxonomia, por demonstrar eficiência na resolução de arranjos taxonômicos (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Quando dados referentes aos caracteres morfológicos dos espermatozóides são analisados em conjunto com outras informações, por exemplo, dados moleculares e também de morfologia externa, o resultado obtido torna-se mais consistente e confiável para um melhor entendimento de suas relações filogenéticas. A especificidade da ultraestrutura dos espermatozóides tem sido alvo de muitos estudos tendo sido inicialmente observada em mamíferos e subsequentemente confirmada para vários grupos de animais, inclusive dos insetos, justificando assim, o uso destas células em estudos taxonômicos e filogenéticos (Dallai *et al.*, 1993; Carcupino *et al.*, 1995; Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

Devido a grande diversidade e incertezas quanto à classificação, o grupo dos insetos tem sido largamente utilizado para estudos da ultraestrutura do espermatozóide. Na literatura, inúmeros são os trabalhos que trazem a ultraestrutura do espermatozóide em representantes de quase todas as Ordens de insetos, sendo as mais representadas: Lepidoptera (Alves *et al.*, 2006), Hymenoptera (Gracielle *et al.*, 2009), Hemiptera (Zhang & Dai, 2012) e Diptera (Name *et al.*, 2012).

## 1.2 A Ordem Diptera

A Ordem Diptera, representada pelas moscas e mosquitos, é considerada uma das ordens megadiversas que constituem a Classe Insecta, sendo também a mais bem catalogada em todas as regiões biogeográficas. Existem mais de 150.000 espécies catalogadas, sendo que para a região Neotropical, cerca de 35.000 já foram descritas (Evenhuis *et al.*, 2008). São insetos holometábolos, tendo sua origem sido estimada para cerca de 250 milhões de anos, no Permiano (Yeats & Wiegmann, 2005).

A Infraordem Brachycera, da qual fazem parte as moscas, é um grupo extremamente bem sucedido, tendo evoluído nos últimos 200 milhões de anos e se diversificado em aproximadamente 80.000 espécies recentes divididas em 95 famílias (Grimaldi & Engel, 2005). Porém, sua diversidade não se restringe apenas a riqueza de espécies, mas também variedade estrutural, hábitos ecológicos e importância econômica.

Diptera é um dos grupos de insetos mais bem estudados, fato esse relacionado com a grande proximidade de várias espécies com a trajetória do ser humano. Algumas delas são consideradas vetores de doenças tais como: malária, febre amarela, leishmaniose, tripanossomíase africana (doença do sono) entre outras, e tiveram uma importante influência na história da humanidade alterando até mesmo o curso de guerras e taxas demográficas (Grimaldi & Engel, 2005). Dessa forma, ao mesmo tempo em que se ampliou o conhecimento acerca das doenças, também impulsionou-se os estudos com relação a seus vetores e espécies correlatas.

### 1.3 A família Drosophilidae

A família Drosophilidae é uma das maiores linhagens que emergiram da pequena radiação dos dípteros acaliptratos (Throckmorton, 1975). É formada por dípteros braquíceros amplamente distribuídos por todas as regiões zoogeográficas. Contém mais de 4.000 espécies compreendidas em 78 gêneros, distribuídas mundialmente, sendo algumas cosmopolitas e outras endêmicas de determinadas áreas (Bächli, 2013). No Brasil, há registros de cerca de 300 espécies distribuídas em 17 gêneros (Chaves & Tidon, 2008).

O gênero *Drosophila* se destaca dentro da família Drosophilidae por abranger cerca de um terço das espécies, organizadas em 8 subgêneros. Dentre eles podemos destacar os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* que juntos abrangem cerca de 1.064 espécies (Bächli, 2013). Contudo, a classificação e posicionamento de muitas espécies dentro da família Drosophilidae ainda gera controvérsias.

O Cerrado brasileiro concentra uma grande quantidade de espécies de drosofilídeos endêmicas da região Neotropical, contudo há também registros da presença de algumas espécies exóticas, algumas delas provenientes da região Afrotropical (*Drosophila simulans* e *Zaprionus indianus*) (Chaves & Tidon, 2008).

Os drosofilídeos possuem interação ativa com o ambiente em que vivem, uma vez que, em sua grande maioria, se alimentam de microorganismos decompositores, principalmente leveduras, encontrados em folhas, flores e frutos em decomposição (Wheeler, 1987; Schmitz *et al.*, 2010), sendo assim importantes na cadeia saprofítica e no processo de sucessão de microorganismos fermentadores.

A distribuição geográfica se relaciona diretamente com fatores abióticos, tais como temperatura e umidade e também com fatores bióticos, tais como a disponibilidade de recursos e a presença de predadores. Todas essas características que afetam a ecofisiologia

desse grupo de insetos, podem estar ligadas com a presença, abundância e sazonalidade ou até mesmo ter influência sobre características reprodutivas das espécies (Markow & Grady, 2008).

A fauna de *Drosophila* da região Neotropical é altamente diversificada, com muitas espécies ainda não descritas (Val *et al.* 1981; Roque & Tidon, 2013). Devido a essa grande diversidade, espécies só podem ser distinguidas por meio da análise da genitália masculina (Vilela, 1992), o que implica uma análise detalhada por parte dos taxonomistas.

As espécies da família Drosophilidae são numerosas em termos de riqueza e abundância, amplamente distribuídas, sensíveis a modificações ambientais, facilmente coletadas e manipuladas em laboratório; características essas que as tornam eficientes como modelo biológico (Powell, 1997). Desse modo, têm sido amplamente estudadas ao longo do tempo, principalmente como modelo em estudos de genética e evolução, por serem um modelo de fácil manipulação e apresentarem um curto período de vida.

Além disso, é cada vez maior o interesse em unir a ecologia e a biologia reprodutiva do grupo com as teorias evolutivas que tentam explicar sua radiação, uma vez que, a distribuição espacial das espécies em ambientes diversificados pode vir a ter influência significativa sobre a biologia reprodutiva das mesmas, o que por sua vez, poderiam influenciar a taxa de diversificação dentro de uma dada linhagem (Markow & Grady, 2008).

Assim como em muitos insetos, o sucesso reprodutivo para ser efetivo necessita que determinados requisitos sejam cumpridos tais como: moscas adultas férteis, serem capazes de achar bons parceiros e bons locais onde possam ovopositar, e que forneçam aos ovos condições favoráveis ao desenvolvimento. Contudo, esses processos reprodutivos podem ser influenciados por fatores como abundância de recursos químicos, espaciais e temporais, além dos fatores abióticos característicos do nicho onde elas habitam (Markow & Grady, 2008).

Outros caracteres como número de ovariolos ou tamanho do testículo também podem estar associados com o potencial reprodutivo das espécies (Telonis-Scott *et al.*, 2005).

É sabido também que entre aves, répteis e insetos as fêmeas possuem órgãos de armazenamento de espermatozoides especialmente adaptados para a seleção espermática. Essa co-evolução entre espermatozoides e órgãos de armazenamento relatado pra várias espécies, em alguns casos pode ter tido influência no desenvolvimento morfológico anormal desses órgãos (Nogushi *et al.*, 2012).

## 2. Justificativa

Poucas espécies pertencentes à Infraordem Brachycera tiveram a estrutura e a ultraestrutura de suas células germinativas estudadas até o momento. Na divisão Cyclorhapha, pode-se citar os trabalhos de Báó e colaboradores (1989) e Dallai & Afzelius (1991), que apresentam uma descrição sobre os espermatozóides de *Ceratitis capitata* (Tephritidae) e *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae), respectivamente. Até o presente momento, são poucos os trabalhos que descrevem a morfologia do espermatozóide em representantes da família Drosophilidae, dentre eles destacam-se: Pantazidis e colaboradores (1992), tendo como objeto de estudo a espécie *Drosophila mojavenis*; Pasini e colaboradores (1996), a espécie *Drosophila subobscura*; Mojica e colaboradores (2000), as espécies *D.dunni* e *D.cardini* e Dallai e colaboradores (2008) com *D.bifurca*, *D. hydei* e *D.kanekoi*. É possível observar nesses estudos a presença de padrões morfológicos distintos na ultraestrutura do espermatozóide dentro da família Drosophilidae, tanto com relação ao formato quanto ao tamanho e tipos existentes.

Assim sendo, a proposta deste trabalho é ampliar e aprimorar os estudos em representantes da família Drosophilidae com dados estruturais e ultraestruturais dos espermatozóides que, somados aos de morfologia do aparelho reprodutor masculino, possam contribuir com caracteres que sejam expressivos para a taxonomia, bem como, para serem utilizados em análises filogenéticas deste grupo de Diptera. Além disso, os dados obtidos ampliarão o conhecimento acerca da biologia reprodutiva de representantes desse grupo.

### **3. Objetivos**

Considerando a complexidade morfológica, as modificações estruturais, a falta de consenso sobre a classificação de algumas espécies e ainda o número reduzido de publicações relacionadas a este grupo, esse trabalho se propõe a estudar representantes da família Drosophilidae (Diptera), tendo como objetivo ampliar os dados disponíveis acerca de sua morfologia, contribuindo assim para um melhor entendimento da biologia e taxonomia deste grupo.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- (1) Caracterizar morfológicamente o aparelho reprodutor masculino interno (estudo da morfologia comparada);
- (2) Caracterizar estrutural e ultraestruturalmente os espermatozoides armazenados nos testículos e vesícula seminal dos machos adultos.
- (3) Comparar a ultraestrutura do espermatozoide entre as espécies, destacando as características mais relevantes.

## 4. Material e Métodos

O estudo foi realizado utilizando-se seis espécies da família Drosophilidae: *Drosophila mercatorum* Patterson & Wheeler 1942, *Drosophila simulans* Sturtevant 1919, *Drosophila cardini* Sturtevant 1916, *Drosophila nebulosa* Sturtevant 1916, *Drosophila sturtevanti* Duda 1927 e *Zaprionus indianus* Gupta 1970.

Os indivíduos adultos foram obtidos da criação mantida pelo Laboratório de Biologia Evolutiva da Universidade de Brasília (UnB) onde são armazenadas em vidros contendo meio de cultura (farinha de milho, açúcar mascavo, fermento biológico, ágar, água e nipagin 10%), a  $24,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ; fotoperíodo 12h/12h. Para a realização dos experimentos, os espécimes foram submetidos à morte por letargia ao frio e tiveram seus órgãos reprodutores removidos.

### 4.1 Microscopia de Luz

Os espécimes foram dissecados em solução de soro fisiológico (0,9%) e tiveram seu aparelho reprodutor interno fotografado no microscópio estereoscópio Zeiss® (STEMI 2000C). Em seguida, os testículos foram rompidos e os espermatozóides espalhados em lâminas histológicas, fixados em solução de glutaraldeído e paraformaldeído, em tampão cacodilato de sódio. Ainda utilizando a microscopia óptica, testículos que foram processados para microscopia eletrônica de transmissão foram seccionados em cortes semi-finos ( $4\mu\text{m}$ ), corados com azul de toluidina-borato de sódio. Para observação e a realização de medidas do núcleo, lâminas contendo espermatozóides foram fixadas previamente com paraformaldeído e lavadas em água corrente. Em seguida as mesmas foram incubadas por 7 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenyndole), lavadas com tampão fosfato de sódio (PBS) e montadas. Todas as preparações foram fotografadas utilizando o microscópio Axiophot Zeiss®, equipado com contraste interferencial ou contraste de fase e fluorescência. Os tamanhos médios do

espermatozóide foram obtidos por meio da medição de 50 espermatozóides adquiridos a partir de 5 indivíduos diferentes de cada espécie.

#### **4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para microscopia eletrônica de transmissão, os testículos foram fixados em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, 5mM CaCl<sub>2</sub> e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 a 4°C por aproximadamente 12h. Pós-fixados por 1h em tetróxido de ósmio 2%, ferricianeto de potássio 1,6% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, em seguida foi feita a contrastação *in block* em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 2h, desidratados em série de acetona (30-100%) e embebidos em resina Spurr's. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente examinados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

Para análise da estrutura dos microtúbulos o material foi fixado, por 24h em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% e ácido tânico 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 seguido de contrastação *“in bloc”* em solução de acetato de uranila 1% em água destilada *“overnight”* (Dallai & Afzelius, 1990). A desidratação, inclusão e observação do material transcorreram de acordo com o protocolo de rotina descrito anteriormente.

Para a detecção de proteínas básicas, foi empregado o método do ácido etanólico fosfotúgstico (EPTA), modificado de Bloom e Aghajanian (1968). Testículos foram fixados apenas em uma solução tamponada de glutaraldeído por 24 h a 4°C. Após lavagem em tampão cacodilato de sódio e desidratado em álcool, o material foi tratado *“in bloc”* com uma solução de PTA 2% em etanol absoluto durante 2 h, à temperatura ambiente e embebida em resina

Spurr. Cortes ultrafinos foram observados antes de serem contrastados e, se necessário, após a contrastação com acetato de uranila.

## 5. Resultados

### 5.1 Microscopia de luz

O aparelho reprodutor interno foi analisado apenas nas seguintes espécies: *D. simulans*, *D. nebulosa*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus*. O resultado da análise comparativa revela semelhança estrutural com as espécies já descritas na literatura. Estruturas comumente encontradas como glândulas acessórias, vesícula seminal e testículos estão presentes em todas as espécies analisadas, contudo apresentam diferenças com relação à posição e tamanho de algumas estruturas como testículos e vesícula seminal. Em todas as espécies os testículos apresentam coloração amarela, onde diferenças na tonalidade são perceptíveis e as glândulas acessórias demonstram-se translúcidas.

Em *D. simulans*, o testículo é um tubo fino e longo, apresenta regiões com coloração amarelada, não homogênea. De sua porção apical até a vesícula seminal, o testículo enrola-se em espiral com duas ou três voltas. A vesícula seminal encontra-se na porção final do testículo, porém é facilmente distinguida por estar separada por uma região que se afunila na parte posterior do testículo, se alargando novamente já na vesícula seminal (Fig.1A). Em *Z. indianus*, o testículo apresenta uma coloração amarelo intenso e seu tamanho é visivelmente maior do que os de *D. simulans*, encontrando-se em formato de espiral com quatro ou mais giros, a vesícula seminal encontra-se na porção final do testículo (Fig.1C).

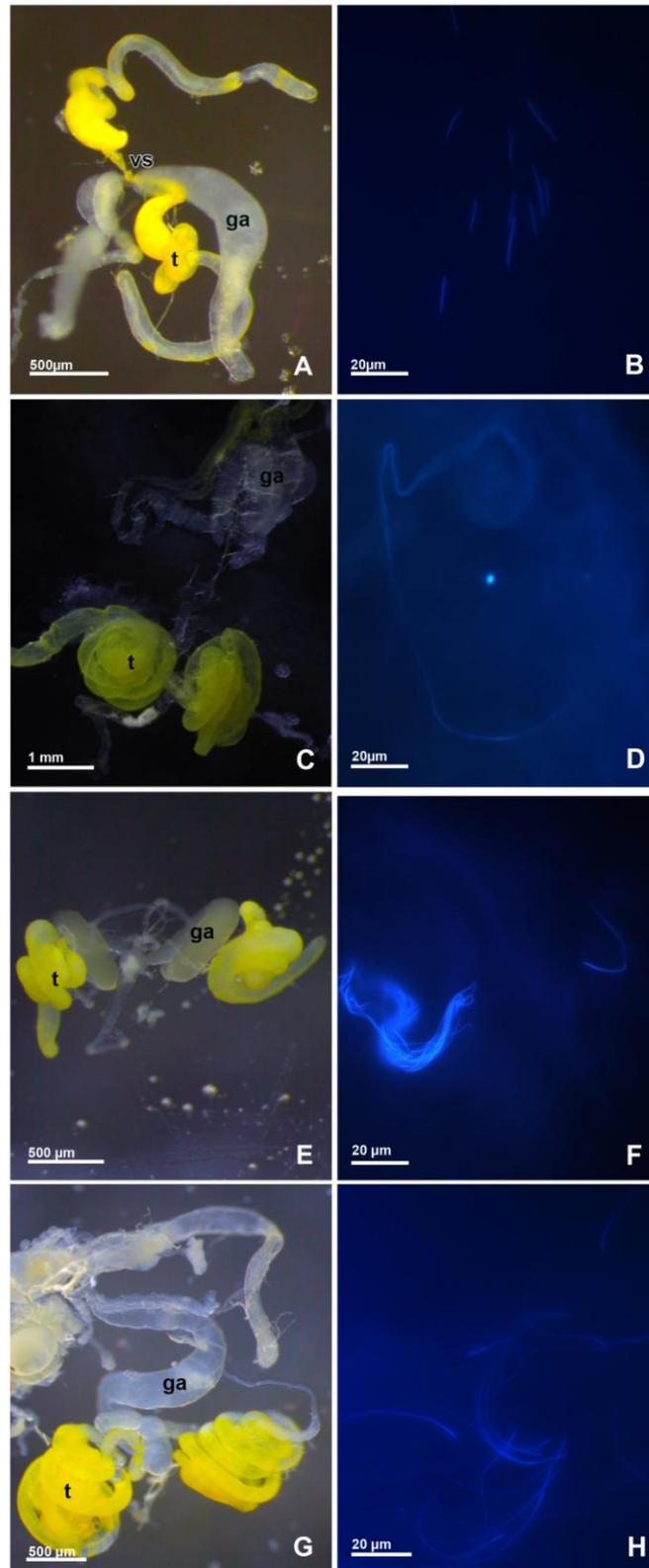
*D. nebulosa* apresenta testículo e vesícula seminal com coloração amarelada, porém, não uniforme em toda a extensão do testículo, ocorrendo variações quanto a tonalidade da coloração. Também trata-se de um tubo fino e alongado que se enrola em 3 ou mais giros, é mais largo na porção média se afunilando nas extremidades (Fig.1E). Em *D. sturtevanti*, o testículo também apresenta coloração amarelada intensa, sendo visivelmente maior do que *D. simulans* e *D. nebulosa*. O testículo enrola-se em 4 ou mais giros assim como *Z. indianus*,

contudo, apresenta um menor comprimento (Fig. 1G). Em todas as espécies analisadas as glândulas acessórias apresentam-se translúcidas. A tabela 1 mostra o comprimento médio do testículo em cada uma das espécies analisadas.

Os espermatozoides das espécies *D. simulans*, *D. nebulosa*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus* são longos, delgados e filiformes. A partir da marcação do núcleo com DAPI obteve-se a medida média do tamanho do núcleo, sendo possível estimar o tamanho da região da cabeça (Figs. 1B, D, F e H). Os valores médios são encontrados na Tabela 1.

**Tabela 1. Tamanho médio do testículo e da região da cabeça do espermatozoide de espécies da família Drosophilidae.**

<b>Espécie</b>	<b>Tamanho médio do testículo (mm)</b>	<b>Tamanho médio do núcleo (μm)</b>
<i>Drosophila simulans</i>	1,21±0,64	08,64±1,39
<i>Drosophila nebulosa</i>	2,11±0,49	33,60±4,46
<i>Drosophila sturtevanti</i>	2,42 ± 0,52	28,82 ± 6,96
<i>Zaprionus indianus</i>	5,33 ± 0,48	243,99 ± 1,25



**Figura 1.** Aparelho reprodutor interno de *D. simulans* (A), *Z. indianus* (C), *D. nebulosa* (E) e *D. sturtevantii* (G). Em B, D, F e H evidenciam-se os espermatozoides das mesmas espécies marcado com DAPI. Abreviaturas: (ga) glândulas acessórias, (t) testículos e (vs) vesícula seminal.

## 5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise da ultraestrutura do espermatozóide das seis espécies da família Drosophilidae, *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. cardini*, *D. nebulosa*, *D. sturtevantii* e *Z. indianus* revelaram que nos testículos a diferenciação das espermátides ocorre no interior de cistos, onde os espermatozoides estão organizados e encontram-se no mesmo estágio de maturação. O número de células germinativas em cada cisto não é constante, variando entre 64 e 128 por cisto (Fig. 2A). A estrutura básica do espermatozóide nas espécies analisadas segue o padrão morfológico comumente encontrado em espermatozóide de insetos compreendendo a região da cabeça, consistindo de um acrossoma e um núcleo, e a região flagelar, contendo os derivados mitocondriais, região do centríolo e axonema. Na região da cabeça, o acrossoma é inserido lateralmente à porção anterior do núcleo que apresenta cromatina altamente condensada com algumas áreas menos densas (Fig. 3A-B). O núcleo durante a espermiogênese passa por um processo de modificação estrutural, alterando-se de um aspecto globular e granulado a um estado de intensa condensação da cromatina e alongamento com algumas regiões menos densas (Fig. 2B-D, 3A-C).

A região de transição núcleo-flagelo é composta pela porção final do núcleo, região do centríolo e pelo início do derivado mitocondrial maior. O derivado mitocondrial situando-se junto ao núcleo e o centríolo (Fig. 3C-D).

A cauda do espermatozóide apresenta um axonema com o arranjo 9+9+2, sendo dois microtúbulos centrais, circundados por nove duplas periféricas de microtúbulos e nove microtúbulos acessórios, cada um deles contendo 13 protofilamentos. Foi observada a presença de material intertubular. As espécies apresentam dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes (Fig. 2E-F, 3E-F, 4A, C e E). O maior contém um material paracristalino que ocupa quase totalmente o interior da estrutura (Fig. 2E, 3F, 4A, C e E). Os

espermatozóides de todas as espécies analisadas possuem um aspecto ultraestrutural próprio sendo possível diferenciá-las de acordo com o padrão morfológico encontrado. Em *D. mercatorum*, pode-se observar uma camada elétron-densa circundando o axonema junto à membrana que envolve o flagelo e o aspecto triangular do derivado mitocondrial menor (Fig. 2E). *D. simulans* apresenta o derivado mitocondrial menor circular e muito reduzido (Fig. 3F). Em *Z. indianus*, os derivados mitocondriais apresentam formato e tamanho diferenciados das outras espécies e ambos possuem material paracristalino (Fig. 4C). *D. nebulosa* por sua vez possuem derivados mitocondriais próximo ao formato triangular, ambos contendo material paracristalino em seu interior.

O resultado obtido através do tratamento com o ácido tânico para todas as espécies nos permitiu observar que os microtúbulos da região do axonema se mostram elétron-densos, em contrapartida os derivados mitocondriais permaneceram sem marcação específica. Também foi possível observar alguns microtúbulos distribuídos ao redor dos espermatozóides. (Figs. 5A-F).

### **5.3 Análise citoquímica**

A técnica do EPTA, que permite o reconhecimento de proteínas básicas, mostrou que na região flagelar, os derivados mitocondriais de *D. mercatorum*, *D. cardini* e *D. nebulosa* apresentaram-se positivamente marcados em sua região periférica, próxima às bordas (Figs. 2G-H; 4C e F). A região do material paracristalino e o axonema não apresentaram marcação positiva para o EPTA.

Em *D. simulans*, *Z. indianus* e *D. sturtevanti* os derivados mitocondriais apresentaram marcação positiva mais intensa na região central, onde está localizado o material

paracristalino (Figs. 3G-H, 4D e H). O axonema apresenta-se positivamente marcado para o EPTA na região entre os microtúbulos.

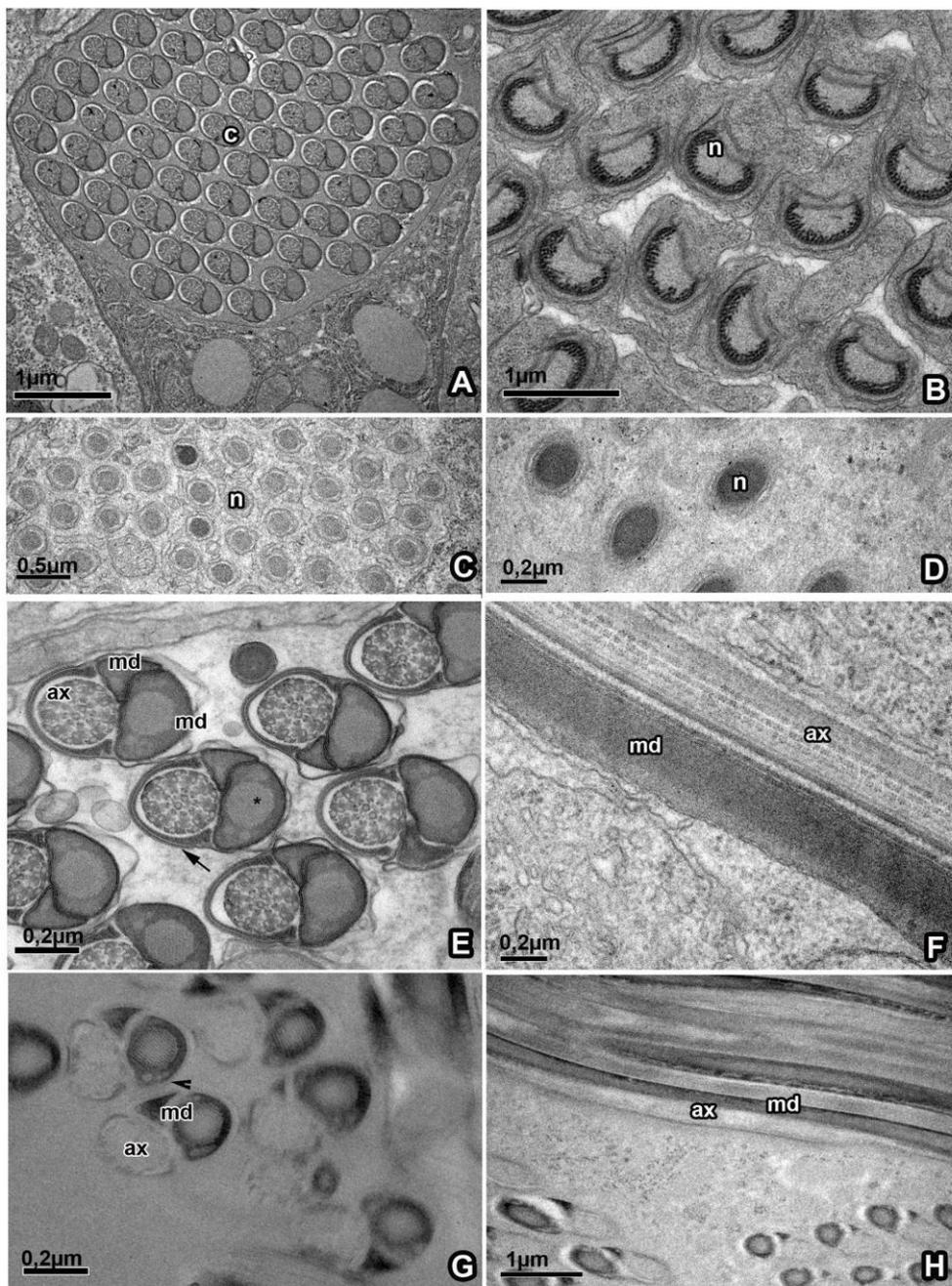
Nas espécies *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus* foi possível observar a presença de regiões circulares elétron-lucentes nos derivados mitocondriais próximo as regiões periféricas (Fig. 2G; 3G; 4D e H).

Aparentemente a ultraestrutura do espermatozoide das espécies analisadas é similar, apresentando apenas algumas particularidades como, por exemplo, a estrutura que circunda o axonema em *D. mercatorum* e os resultados diferenciados vistos na análise citoquímica.

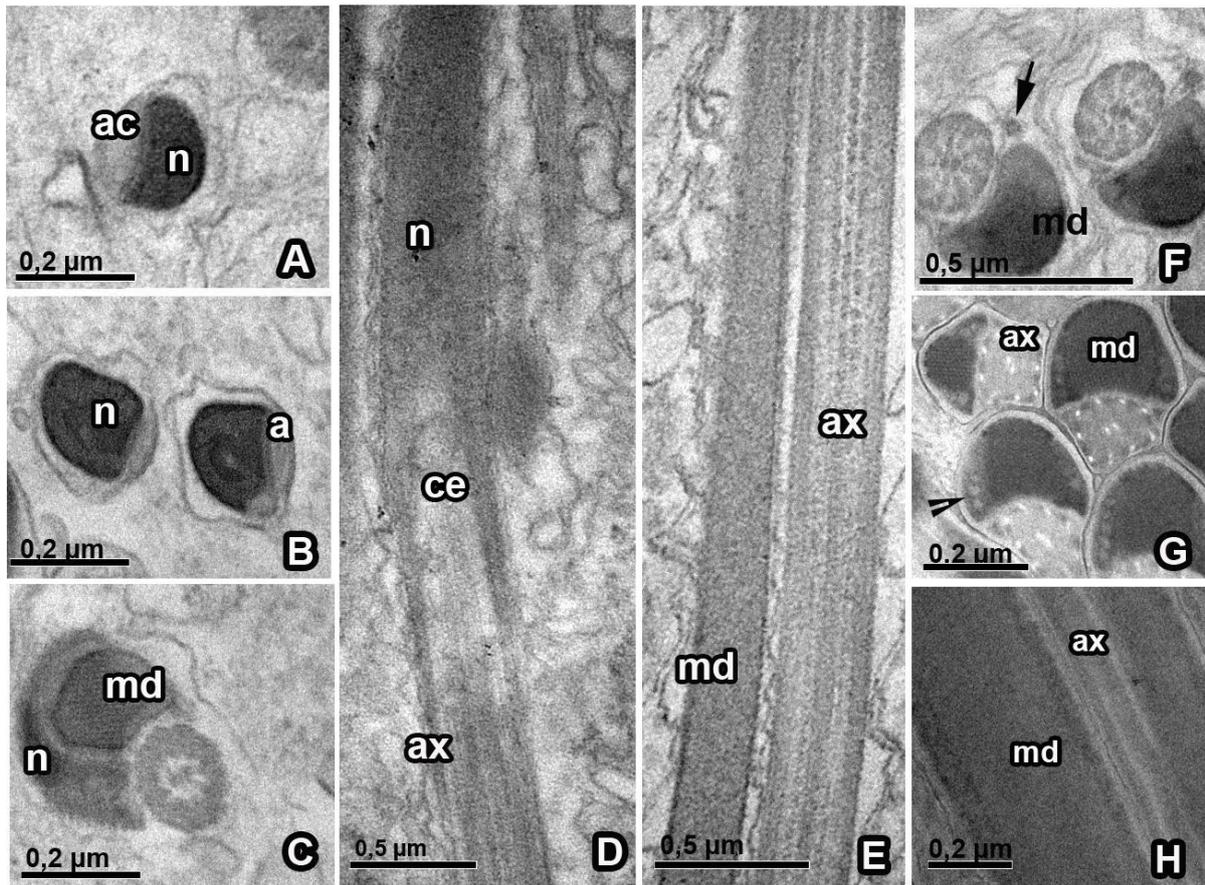
A tabela 2 faz um resumo geral dos resultados obtidos com a análise da ultraestrutura da região da cauda para as seis (6) espécies da família Drosophilidae.

**Tabela 2. Quadro geral mostrando as principais características encontradas para a ultraestrutura da região da cauda.**

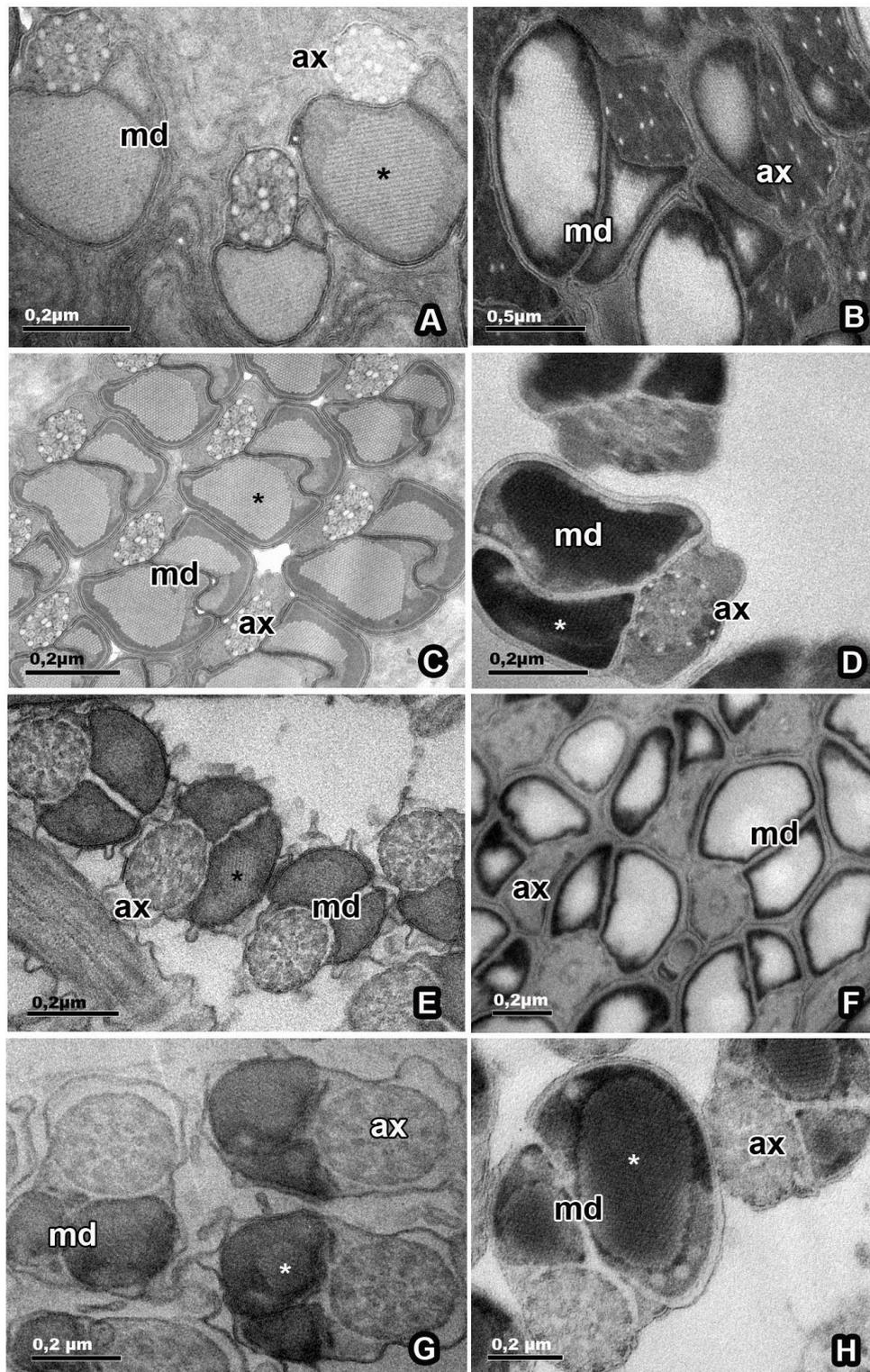
Espécies	Axonema 9+9+2	Camada elétrón- densa ao redor do axonema	Derivados mitocondriais				Região positiva ao EPTA nos derivados mitocondriais	
			Morfologia		Material paracristalino			
			Maior	Menor	Maior	Menor	Periférica próximo as bordas	Material paracristalino
<i>Zaprionus indianus</i>	+	-	Poligonal	Poligonal	+	+	-	+
<i>Drosophila mercatorum</i>	+	+	Semicircular	Triangular	+	-	+	-
<i>Drosophila cardini</i>	+	-	Oval	Triangular	+	+	+	-
<i>Drosophila simulans</i>	+	-	Semicircular	Circular reduzido	+	-	-	+
<i>Drosophila nebulosa</i>	+	-	Triangular	Triangular	+	+	+	-
<i>Drosophila sturtevantii</i>	+	-	Oval	Triangular	+	+	-	+



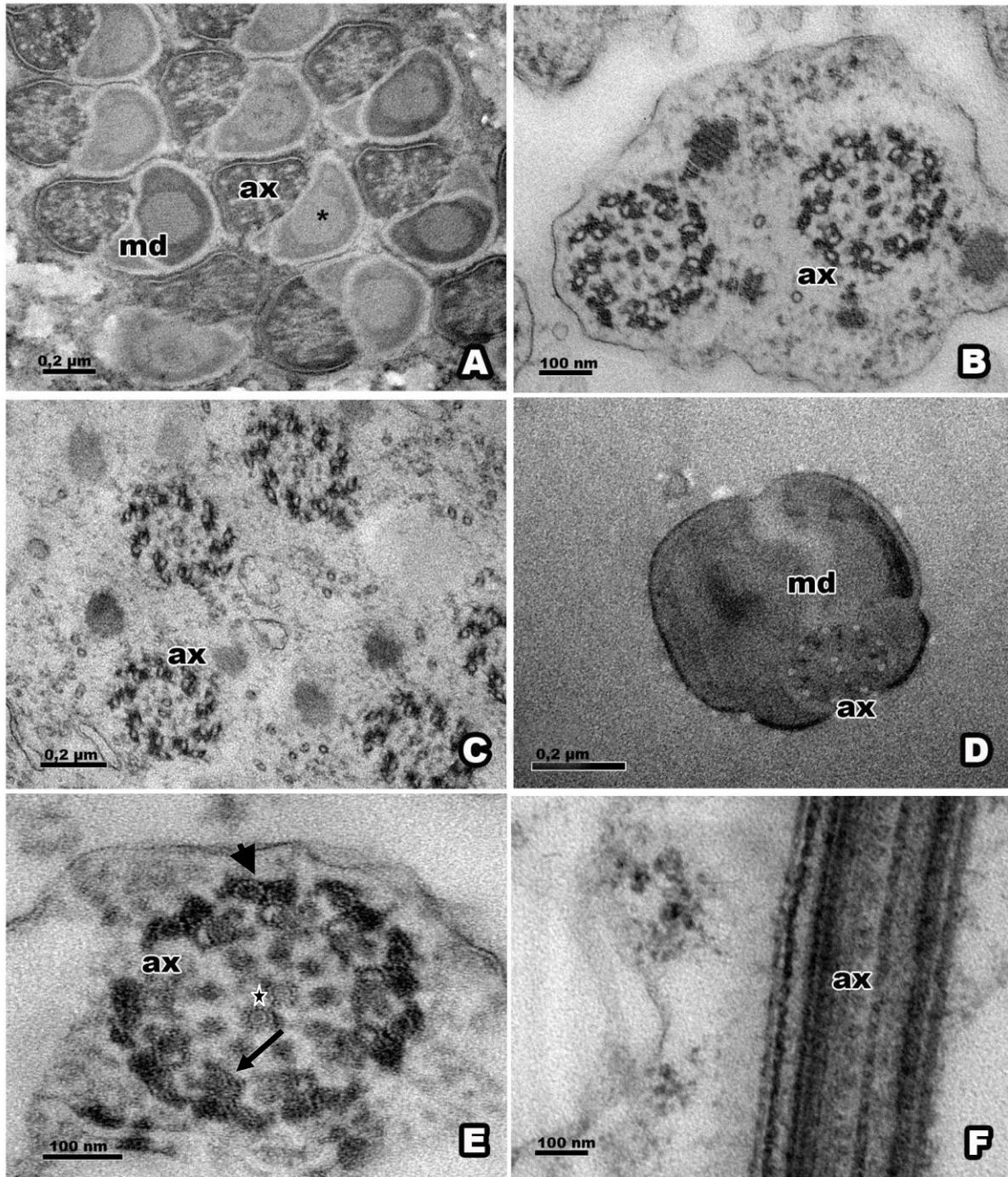
**Figuras 2.** Micrografias eletrônicas de transmissão do espermatozóide de *D.mercatorum*. (A) Corte transversal dos espermatozoides no cisto. (B-D) Cortes transversais da região do núcleo, sofrendo modificações ao longo da espermiogênese até a completa compactação no espermatozóide. (E) Corte transversal mostrando a região do axonema e os derivados mitocondriais. O derivado mitocondrial maior apresenta material paracristalino (\*). Há a presença de uma camada elétron densa circundando o axonema (seta). (F) Corte longitudinal da região da cauda, evidenciando o axonema e os derivados mitocondriais. (G-H) Cortes transversal e longitudinal do espermatozóide tratado com EPTA. Derivados mitocondriais são marcados positivamente em quase toda sua extensão, exceto no material paracristalino e algumas regiões próximas as extremidades (cabeça de seta). Abreviaturas: (ax) axonema, (c) cisto, (md) derivado mitocondrial, (n) núcleo.



**Figura 3.** Micrografia eletrônica da ultraestrutura do espermatozóide de *D. simulans*. (A) O acrossoma localizando-se lateralmente em relação à porção anterior do núcleo. (B) Cortes transversais da região do núcleo mostrando a cromatina altamente condensada. (C-D) Região de transição núcleo-flagelo. Em (C) é possível visualizar o derivado mitocondrial situando-se junto ao núcleo e o centríolo e em (D) corte longitudinal evidenciando o núcleo, a região do centríolo e o axonema. (E-F) Corte longitudinal e transversal, respectivamente, mostrando os derivados mitocondriais e o axonema. Em (F) é possível ver o material paracristalino no centro do derivado mitocondrial maior. A seta evidencia o derivado mitocondrial menor. (G-H) Cortes transversal e longitudinal, respectivamente, do espermatozóide tratado com EPTA. Derivados mitocondriais são marcados positivamente, com material paracristalino também marcado. É possível observar algumas áreas não marcadas próximas à extremidade dos derivados mitocondriais maiores (seta). **Abreviaturas:** (ac) acrossoma, (ax) axonema, (ce) centríolo, (md) derivado mitocondrial, (n) núcleo.



**Figura 4.** Micrografias eletrônicas da ultraestrutura do espermatozóide das espécies *D. cardini* (A-B), *Z. indianus* (C-D), *D. nebulosa* (E-F) e *D. sturtevanti* (G-H) evidenciando-se as estruturas encontradas na região da cauda. A, C, E e G foram processados como de rotina, nelas é possível visualizar os derivados mitocondriais de tamanhos diferenciados e o axonema. Em B, D, F e H evidenciam-se os espermatozóides tratados com o EPTA. **Abreviaturas:** (ax) axonema, (md) derivado mitocondrial, (\*) material paracristalino.



**Figura 5.** Micrografias eletrônicas da ultraestrutura do espermatozóide, tratado com ácido tânico, das espécies *D. mercatorum* (A), *D. simulans* (B), *D. nebulosa* (C), *Z. indianus* (D) e *D. sturtevantii* (E-F). Em (E), evidencia-se a estrutura do axonema, formado pelos microtúbulos acessórios (**cabeça de seta**), microtúbulos periféricos (**seta**) e dupla central (**estrela**). Abreviaturas: (**ax**) axonema, (**md**) derivado mitocondrial.

## 6. Discussão

### 6.1 Microscopia de luz

O aspecto morfológico do aparelho reprodutor interno das espécies *D. simulans*, *D. nebulosa*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus* condiz com o descrito para outras espécies da família Drosophilidae (Demerec, 1950; Joly *et al.*, 2003, Rego *et al.*, 2013). A variação quanto ao tamanho dos testículos também está presente na literatura, sendo descrita como variável, uma vez que, está diretamente relacionada com o tamanho do espermatozóide (Pitnick & Markow, 1994). Alguns testículos encontram-se dispostos com formato em espiral, fator esse, dependente do tamanho. Essa grande diversidade com relação aos tamanhos foi relatada por Patterson (1943), que contou o número de giros e voltas dadas pelo testículo em várias espécies de *Drosophila*, chegando a uma variação que vai de 1 a 28.

As glândulas acessórias apresentaram morfologia aparentemente similar nas espécies analisadas. Segundo Heifetz e colaboradores (2001), as proteínas presentes nas glândulas dos machos induzem tanto a postura quanto a progressão oogênica nas fêmeas.

As dimensões do núcleo dos espermatozoides encontradas para *D. simulans* está de acordo com o que está disponível na literatura, segundo Joly e colaboradores (1997), o tamanho médio do espermatozóide de *D. simulans* é de 1,2 mm. Não foi encontrado nenhum dado a respeito das dimensões do espermatozóide de *D. sturtevanti*. A relação entre dimensão da cabeça e do flagelo está fortemente relacionada, sendo facilmente perceptível a existência de polimorfismo baseado na variação de tamanhos encontrados para a região da cabeça (Beatty & Burgoyne, 1971; Snook & Karr, 1998).

Há relatos na literatura para as espécies *D. simulans* (Joly *et al.*, 1997), *D. nebulosa* (Kraaijeveld *et al.*, 2008) e *Z. indianus* (Rego *et al.*, 2013), quanto ao tamanho médio do testículo. Os dados que foram obtidos nesse estudo estão de acordo com o que foi descrito anteriormente. É possível ver a existência de uma relação entre o tamanho do espermatozóide

e o tamanho dos testículos o que já havia sido relatado por Pitnick e Markow (1994). Apesar de nesse estudo terem sido realizadas apenas as medições da região da cabeça, tem-se a possibilidade de se ter uma idéia do tamanho do espermatozóide unindo-se os dados do tamanho do testículo e da região da cabeça. Em geral, espermatozoides que possuem mais de 1mm são difíceis de serem mensurados, justamente pela impossibilidade de se garantir se eles estão íntegros ou não (Joly *et al.*, 1997).

## **6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

O processo de espermiogênese segue o que já foi descrito anteriormente para outros dípteros próximos (Dallai & Afzelius, 1991; Bão & de Souza, 1993) e também para *Drosophila*, passando o núcleo de um estágio de cromatina dispersa a um estágio de completa condensação (Fabian & Brill, 2012).

Os aspectos ultraestruturais encontrados para os espermatozoides das espécies *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. cardini*, *D. nebulosa*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus* estão de acordo com o padrão geral encontrado para dípteros e também para o que foi descrito para outras espécies de drosofilídeos (Dallai & Afzelius, 1991; Pasini *et al.* 1996; Mojica *et al.*, 2000, Dallai *et al.*, 2008 e Rego *et al.*, 2013). O posicionamento lateral do acrossoma em relação ao núcleo visto neste trabalho também segue o padrão para *Drosophila* já descrito anteriormente para outras espécies (Jamieson, 1987; Pasini *et al.*, 1996).

A presença de dois derivados mitocondriais é comumente descrita para as ordens mais complexas de insetos (Phillips, 1970; Baccetti, 1972), porém tanto para os drosofilídeos analisados quanto para as descrições encontradas na literatura, temos uma variação quanto ao tamanho e formato dessas estruturas. O aspecto morfológico encontrado para o derivado mitocondrial nas espécies analisadas mostra a especificidade desse caracter, uma vez que, nenhuma delas revelou morfologia idêntica às demais. O arranjo apresentado pelo axonema

das espécies aqui descritas segue o arranjo clássico descrito para os representantes da infra-ordem Brachycera (Dallai *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1999), sendo dois microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (9+9+2). Esse arranjo também é comumente encontrado em outras ordens de inseto como, por exemplo, Hymenoptera e Hemiptera (Chawanji *et al.*, 2006; Gracielle *et al.*, 2009).

O número de protofilamentos encontrados na parede dos microtúbulos acessórios apresenta-se contendo 13 protofilamentos, número este comumente encontrado na ordem Diptera, mais especificamente Brachycera.

Tanto o axonema quanto os derivados mitocondriais são necessários para que haja a mobilidade do flagelo, sendo o primeiro responsável pela ação mecânica por meio da ação de proteínas motoras e os segundos pelo fornecimento da energia. Contudo, estudos recentes demonstraram que o papel do derivado mitocondrial maior vai muito além do que somente uma fonte energética. Noguchi e colaboradores (2012) verificaram que o derivado mitocondrial maior é de extrema importância para que o processo de alongação do espermatozóide ocorra, servindo ao longo do processo como suporte estrutural juntamente com os microtúbulos citoplasmáticos localizados ao redor da espermátide ao longo da espermiogênese.

O padrão morfológico descrito para os derivados mitocondriais de *D. simulans* se assemelha bastante com o descrito para *D. melanogaster* (Tokuyasu *et al.*, 1972; Dallai *et al.*, 2008), isso pode estar relacionado ao fato das duas espécies serem espécies irmãs e pertencerem ao grupo melanogaster dentro do sub-gênero *Sophophora*, segundo Bächli (2013), o que porventura poderia significar uma maior aproximação dos padrões morfológicos dos espermatozóide de espécies mais proximamente relacionadas do que outras.

O mesmo pode ser observado, com relação à cobertura elétron-densa encontrada em *D. mercatorum*. Dallai e colaboradores (2008) demonstraram, por meio de imunomarcção

com Concavalina A, que a camada elétron densa que aparece envolvendo o axonema em *D. hydei*, *D. kanecoi* e *D. bifurca* é recoberta por uma fina camada de glicocálix. Essa camada elétron-densa somente foi descrita para essas espécies, que assim como *D. mercatorum*, pertencem ao grupo repleta dentro do sub-gênero *Drosophila* (Bächli, 2013).

*Z. indianus*, em comparação com as outras cinco (5) espécies, teria apresentado o padrão ultraestrutural mais distinto tanto com relação ao formato quanto ao tamanho dos caracteres morfológicos, isso pode estar relacionado ao fato dela não pertencer ao mesmo gênero das outras espécies.

### 6.3 Análise citoquímica

As características observadas quanto à marcação com ácido etanólico fosfotúgstico (EPTA) para as espécies *D. mercatorum*, *D. cardini* e *D. nebulosa* revelaram que as proteínas básicas se encontram localizadas nas regiões periféricas dos derivados mitocondriais, não estando presentes na região do material paracristalino. Essas características se assemelham ao que foi descrito para a espécie *Cochliomyia macellaria* (Name *et al.*, 2012). Já para as espécies *D. simulans*, *D. sturtevantii* e *Z. indianus* a análise mostrou uma localização das proteínas básicas mais central, na região do material paracristalino, assim como foi descrito para outros Diptera como: *Culex quinquefasciatus* (Báo *et al.*, 1992) e *Chrysomia megacephala* (Name *et al.*, 2010).

Nas espécies *D. simulans*, *D. nebulosa*, *D. sturtevantii* e *Z. indianus* foi observado a marcação positiva do material intertubular para o EPTA, fato esse também já relatado na literatura para a espécie *Chrysomia megacephala* (Name *et al.*, 2010).

## 7. Conclusão

Os dados obtidos ao longo desse estudo, a partir da descrição da ultraestrutura do espermatozóide de *D. mercatorum*, *D. simulans*, *D. cardini*, *D. nebulosa*, *D. sturtevanti* e *Z. indianus*, estão de acordo com o que foi descrito anteriormente para outros representantes da família Drosophilidae.

Características como a morfologia dos testículos e as dimensões do espermatozóide apresentaram-se de forma diferenciada nas espécies analisadas, corroborando com a ideia de outros estudos acerca da especificidade desses caracteres dentro da família Drosophilidae. Essa especificidade da morfologia tanto do aparelho reprodutor interno do macho, tamanho e ultraestrutura do espermatozóide mostram que estas são boas fontes de dados, capazes de fornecerem caracteres passíveis de utilização futura, na tentativa de elucidar dúvidas de taxonomia e filogenia dentro da família Drosophilidae.

A diversidade morfológica encontrada na ultraestrutura do espermatozóide também revela uma especificidade morfológica a níveis ultraestruturais, onde as características encontradas para as estruturas da região da cauda, como os derivados mitocondriais, são distintas em cada espécie.

Até o presente momento são poucos os estudos que abordam a morfologia da ultraestrutura dos espermatozoides, dessa forma, fazem-se necessários mais estudos envolvendo o maior número de espécies possíveis de forma que a base de dados atualmente existente seja ampliada.

## 8. Referências Bibliográficas

- Alves, L.; Mancini, K.; Lino-Neto, J. & Dolder, H. 2006. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Acta Zoologica**. **87**(2): 131-139.
- Baccetti, B. 1972. Insect sperm cell. **Advances in Insect Physiology**. **9**: 315-397.
- Baccetti, B. & B.A. Afzelius. 1976. The biology of the sperm cell. **Basel**, New York, Karger, 254p.
- Baccetti, B; Dallai, R. & Callaini, G. 1981. The spermatozoon of arthropoda. 32. *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, 3: 87-99.
- Bächli, G. 2013. TaxoDros: The database on Taxonomy of Drosophilidae. Electronic Database accessible at <http://www.taxodros.unizh.ch>. Acessado em: 01 de junho 2013.
- Báo, S.N.; Quargio-Grassoto, I. & Dolder, H. 1989. Acrossome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Cytobios**, **58**: 93-100.
- Báo, S.N.; Lins, U.; Farina, M. & Souza, W. 1992. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) Spermatozoon: Some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. **Journal of Structural Biology**. **109**: 46-51.
- Báo, S.N. & De Souza, W. 1993. Ultrastructural and cytochemical studies of the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Submicroscopy Citology and Patology**. **25** (2): 213-222.
- Beatty, R.A. & Burgoyne, P.S.1971. Size classes of the head and flagellum of *Drosophila* species. **Cytogenetics**. **10**:177-185.
- Bloom, F.E. & Aghajanian, G.K. 1968. Fine structure and cythochemical analysis of staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. **Journal of Ultrastructure Research**. **22**: 361-375.
- Carcupino, M.; Profili, G.; Kathiritamby, J. & M. Mazzini. 1995. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of

- Strepsiptera (Insecta). **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, **166**: 291-296.
- Chaves, N.B. & Tidon, R. 2008. Biogeographical aspects of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) of the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**. **52**:340-348.
- Chawanji, A. S.; Hodgson, A. N. & Villet, M. H. 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). **Tissue and Cell**. **38**: 373–388.
- Dallai, R. & B.A. Afzelius. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. **Journal of Structural Biology**, **103**: 164-179.
- Dallai, R. & Afzelius, B.A. 1991. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Drosophilidae) (Diptera), **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **20**: 215-222.
- Dallai, R.; Bellon, P.L.; Lanzavecchia, S. & B.A. Afzelius. 1993. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. **Zoologica Scripta**. **22**: 193-202.
- Dallai, R; Mercati, D; Giusti, F. 2008. Structural organization of the “zipper line” in *Drosophila* species with giant spermatozoa. **Journal of Structural Biology**, **161**: 43-54.
- Demerec, M.(Ed). 1950. Biology of *Drosophila*. **John Wiley & Sons**, New York.
- Evenhuis, N. L., Pape, T., Pont, A. C. & Thompson, F. C. (editors). 2008. Biosystematic Database of World Diptera, Version 8.5  
[www.sel.barc.usda.gov/diptera/names/Status/Stat\\_NT.htm](http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/names/Status/Stat_NT.htm). Acessado em: 05 de agosto de 2013.
- Fabian, L. & Brill, J.A. 2012. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. **Spermatogenesis**. **2**(3): 197-212.
- Franzen, Å. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis, In: Bacetti, B. (ed.). 1970. **Comparative Spermatology**, NY, Academic Press. pp.29-46.

- Gracielle, I.M.S.; Fiorillo, B.S.; Lino-Neto, J. & Bao, S.N. 2009. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Himenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**. **40**: 419-425.
- Grimaldi, D. & Engel, M.S. 2005. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press: 514 pp.
- Heifetz, Y.; Tram, U. & Wolfner, M.F. 2001. Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences**. **268**: 175-180.
- Higginson, D.M.; Miller, K.B.; Segraves, K.A. & Pitnick, S. 2012. Female reproductive tract form drives the evolution of complex sperm morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **109**:4538–4543.
- Jamieson, B.G.M. 1987. **Ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. University Press, Cambridge. 320p.
- Jamieson, B.G.M.; Dallai, R. & Afzelius, B. A. 1999. Spermatozoal Phylogeny of the Vertebrata, In: Gagnon C. (ed.), *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River. Press. Vienna (EUA). p.301– 331
- Joly, D.; Bazin, C.; Zeng, L. & Singh, R. S. 1997. Genetic basis of sperm and testis length differences and epistatic effect on hybrid inviability and sperm motility between *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. **Heredity**. **78**: 354-362.
- Joly, D.; Bressac, C.; Jaillard, D.; Lachaise, D. & Lemullois, M. 2003. The sperm roller: a modified testicular duct linked to giant sperm transport within the male reproductive tract. **Journal of structural biology**. **142**: 348-355.
- Joly, D.; Korol, A. & Nevo, E. 2004. Sperm size evolution in *Drosophila*: inter- and intra-specific analysis. **Genetica**. **120**: 233–244.
- Kraaijeveld, K.; Denniff, M.; Baker, R.H. & Chapman, T. 2008. The evolution of sperm and non-sperm producing organs in male *Drosophila*. **Biological Journal of the Linnean Society**. **94**: 505-512.

- Markow, T.A. & Grady, P.O. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. **Functional Ecology** **22**: 747-759. British Ecological Society
- Mojica, J.M; File-Emperador, S; Bruck, D.L. 2000. Sperm bundle and spermatozoon ultrastructure in two species of the cardini group of *Drosophila*. **Invertebrate Reproduction and Development**. **37**(2): 147-155.
- Name, K.P.O.; Pujol-Luz, J.R. & Bao, S.N. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Micron**. **41**: 853-860.
- Name, K.P.O.; Barros-Cordeiro, K.B.; Gama Filho, Wolff, M.; Pujol-Luz, J.R & Bao, S.N. 2012. Morphological and cytochemical aspects of spermatozoa in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Electron Microscopy** **61**(6): 415-422.
- Noguchi, T.; Koizumi, M. & Hayashi, S. 2012. Mitochondria-driven cell elongation mechanism for competing sperms. **Fly**, **6**(2): 113-116.
- Pantazidis, A.C; Zouros, E. & Galanopoulos, V.K. 1992. Species-specific characteristics of spermatogenesis in *Drosophila mojavensis* (Patterson) (Diptera: Drosophilidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. **21**(4): 351-363.
- Pasini, M.E; Redi, C.A; Caviglia, O. & Perotti, M.E. 1996. Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. **Tissue & Cell**. **28**(2): 165-175.
- Patterson, J.T. 1943. Studies in genetics of *Drosophila*. In: *Drosophilidae of the Southwest*. Universidade do Texas. **4313**(3): 1-203.
- Phillips, D.M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **Journal of Cell Biology**. **44**: 243-277.
- Pitnick, S. & Markow, T. A. 1994. Male gametic strategies: sperm size, teste size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila panchea* and its relatives. **The American Naturalist**. **143**: 785-819.
- Pitnick, S.; Spicer, G. S. & Markow, T. A. 1995. How long is a giant sperm ? **Nature**. **375**: 109.
- Powell, J.R. 1997. Progress and prospects in evolutionary biology: the *Drosophila* model. Oxford University Press, New York. xiv + 562p.

- Rego, L.N.A.A.; Silistino-Souza, R.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. & Madi-Ravazzi, L. 2013. Spermatogenesis of *Zaprionus indianus* e *Zaprionus sepsoides* (Diptera, Drosophilidae): Cytochemical, structural and ultrastructural characterization. **Genetics and Molecular Biology**. **36** (1): 50-60.
- Roque, F. & Tidon, R. 2013. Five new records of drosophilids (Diptera) in a riparian forest in the Brazilian savanna, an endangered Neotropical biome. **Annals of the Entomological Society of America**. **106** (1): 117-121.
- Schmitz, H.J.; Hofmann, P.R.P.; Valente, V.L.S. 2010. Assemblages of drosophilids (Diptera, Drosophilidae) in mangrove forests: community ecology and species diversity. **Iheringia. Série Zoologia** (Impresso), v. 100, p. 133-140.
- Snook, R.R. & Karr, T.L. 1998. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. **Current Biology**. **8**: 291-294.
- Telonis-Scott, M.; McIntyre, L.M. & Wayne, M.L. 2005. Genetic architecture of two fitness-related traits in *Drosophila melanogaster*: ovariole number and thorax length. **Genetica**, **125**: 211–222.
- Throckmorton, L. H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. Pp. 421–469 In: King, R.C: **Invertebrates of Genetic Interest**. Plenum Press, New York.
- Tokuyasu, K.T.; Peacock, W.J. & Hardy, R.W. 1972. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling Process. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. **127**(4): 492-525.
- Val, F.C.; Vilela, C.R. & Marques, M.D. 1981, Drosophilidae of the Neotropical region. In: M. Ashburner; H. L. Carson & J. N. Thompson, J. N. (eds), **The Genetics and Biology of Drosophila**. 3o Vol., Academic Press., London. 123-168pp.
- Vilela, C. R. 1992, On the *Drosophila tripunctata* species group (Diptera, Drosophilidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, **36**: 197-221.
- Wheeler, M.R. 1987. Drosophilidae. In: J.F. McAlpine *et. Al* (Eds). **Manual of Nearctic Diptera**. Vol.2 1011-1018pp. Monogr. No. 28 , Canada: Res. Branch. Agric.

Yeates, D. K., & B. M. Wiegmann. 2005. Phylogeny and evolution of Diptera: recent insights and new perspectives, in Yeates, D. K. and B. M. Wiegmann, eds. The **Evolutionary Biology of Flies**. Columbia University Press.

Zhang, B. & Dai, W. 2012. Ultrastructure of the spermatozoa of *Cicadella viridis* (Linnaeus) and its bearing on the phylogeny of Auchenorrhyncha. **Micron**. **43** (9): 978-984.